

Concentración mínima letal de higromicina B en la formación de callos y multiplicación de brotes de *Digitalis purpurea* L.

Elizabeth Kairúz Hernández-Díaz^{1,2}, Naivy Pérez-Alonso², Alina Capote², Anabel Pérez², Elio Jiménez², Borys Chong-Pérez^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

²Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: boris@ibp.co.cu.

RESUMEN

Las plantas del género *Digitalis* se caracterizan por producir cardenólidos, que se emplean como medicamentos a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En investigaciones anteriores se desarrolló un protocolo de transformación de discos foliares de *Digitalis purpurea* L., en el cual se obtuvieron plantas no transformadas (escapes) luego del proceso de selección con geneticina. Consecuentemente, es necesario desarrollar un esquema de selección más eficiente en el cual se utilice otro agente selectivo. El objetivo de este trabajo fue seleccionar la concentración mínima letal de higromicina B en el proceso de formación de callos y multiplicación de brotes de *D. purpurea*. Para ello se evaluó el efecto de las concentraciones de 3-15 mg l⁻¹ de este antibiótico en discos foliares, luego de 28 días en medio de cultivo semisólido de formación de callos y el efecto de las concentraciones de 25-100 mg l⁻¹, en medio de cultivo de multiplicación de brotes, durante 30 días. La mínima concentración a la cual se produjo la mortalidad del 100% del tejido fue de 12 mg l⁻¹, en medio de formación de callos y de 75 mg l⁻¹ en medio de multiplicación de brotes, esta última luego de no menos de 30 días. El esquema de selección propuesto se recomienda para futuros trabajos de transformación genética en esta especie.

Palabras clave: cardenólidos, *hpt*, selección, transformación genética

Minimal lethal concentration of hygromycin B in calli induction and shoot multiplication process of *Digitalis purpurea* L.

ABSTRACT

The plants of the genus *Digitalis* are characterized by the production of cardenolides, drugs widely used worldwide in the treatment of heart failure. In previous research a transformation protocol was developed from leaf disc of *Digitalis purpurea* L., using geneticin as selection marker. However some escapes in the selection process were obtained. So it is necessary to develop a more efficient selection scheme using another selective agent. Therefore, the aim of the present research was to select the minimum lethal concentration of hygromycin B during callus induction and shoots multiplication of *D. purpurea*. For callus induction we studied five concentrations of hygromycin B (3, 6, 9, 12, 15 mg l⁻¹) during 28 days. Besides, the effect in shoot multiplication of four concentrations of hygromycin B (25, 50, 75, 100 mg l⁻¹) was studied during 30 days. The minimal lethal concentration for callus formation was 12 mg l⁻¹. In the case of shoot multiplication, 100% mortality was showed at 75 mg l⁻¹ strictly after 30 days. The proposed selection scheme is recommended for future work at genetic transformation in this species.

Keywords: cardenolides, genetic transformation, *hpt*, selection

INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances en la química sintética, las fuentes naturales aún son imprescindibles para la obtención de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. Este es el caso de las plantas del género *Digitalis*, única fuente viable para la obtención de cardenólidos. Estos

constituyen los medicamentos más extensamente empleados a nivel mundial en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Gavidia *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2010) y tienen interés farmacológico creciente, debido a sus potencialidades como anticancerígeno (Sales *et al.*, 2011). Por tanto, son necesarios el cultivo, la producción, los estudios biotecnológicos y el

mejoramiento genético de plantas medicinales, como *Digitalis*.

El cultivo *in vitro* en especies de *Digitalis* comenzó a desarrollarse por las ventajas asociadas a sus facilidades de automatización e uniformidad para la producción de cardenólidos. Diversos estudios permitieron dilucidar que la organogénesis era el factor primario que determinaba la síntesis de cardenólidos, así como que la luz estimula la biosíntesis una vez que los tejidos productores ya están formados (Hagimori *et al.*, 1982a,b; Eisenbeiß *et al.*, 1999). La producción de biomasa de *D. purpurea* a partir de sistemas de inmersión temporal, se considera la estrategia más viable que combina las bondades del cultivo *in vitro* y los requerimientos de diferenciación celular necesarios para obtener niveles de cardenólidos superiores a los determinados en el cultivo *in vitro* (Pérez-Alonso *et al.*, 2009). Sin embargo, han sido considerablemente inferiores a los alcanzados en condiciones naturales.

Debido a los bajos niveles de cardenólidos obtenidos durante el cultivo *in vitro* de plantas de *Digitalis purpurea* L., es necesario buscar otras vías atractivas para la potenciación de la producción de estos metabolitos secundarios, tales como la transformación genética. La expresión de uno o varios genes involucrados en la ruta de biosíntesis de los cardenólidos, es una alternativa promisoría para obtener plantas con una productividad elevada (Capell y Christou, 2004). Como ventaja adicional, esta estrategia se podría combinar con otras, como la producción en sistemas de inmersión temporal y/o la elicitación, lo que permitiría propagar masivamente plantas transformadas con una productividad más elevada y uniforme que la registrada en condiciones naturales.

Para la obtención de plantas modificadas genéticamente son imprescindibles varias condiciones. En primer lugar, un sistema de regeneración que permita obtener plantas a partir de una o pocas células. Seguidamente, un protocolo que posibilite la transferencia del ADN foráneo a las células vegetales, unido a un sistema de selección eficiente para diferenciar las células que contienen el o los transgenes. Por último, se necesita un gen candidato para el carácter que se quiere modificar (Capell y Christou, 2004; Izquierdo *et al.*, 2010).

La concentración mínima letal de geneticina (G418) durante el proceso de formación de callos de *D. purpurea* (50 mg l⁻¹) fue determinada por Chong-Pérez *et al.* (2008) y aplicada en un protocolo de transformación de esta especie (Izquierdo, 2010). Sin embargo, se obtuvieron plantas que no contenían ninguno de los genes transferidos vía *Agrobacterium tumefaciens*, por lo que constituían escapes del proceso de selección. Estas evidencias experimentales demuestran que es necesario modificar el proceso de selección. Las posibles soluciones incluyen el aumento de la concentración de G418 (>50 mg l⁻¹) o de la duración del proceso de selección. Ambas opciones poseen como desventaja el incremento de los costos asociados al empleo de geneticina durante tiempos y concentraciones superiores. Otra alternativa, podría ser la utilización de otro agente selectivo de la misma naturaleza, como higromicina B.

La higromicina B es el segundo antibiótico de uso más frecuente en el proceso de selección de eventos transgénicos, debido en parte a su alta toxicidad para las plantas (Padilla y Burgos, 2010). El gen de *Escherichia coli* *aphIV* (*hpt*) codifica para la enzima higromicina B fosfotransferasa, que confiere resistencia a este aminoglucósido en bacterias, hongos, células vegetales y animales. Es usual su empleo como gen marcador de selección cuando el gen *nptII* no ha sido efectivo (Miki y McHugh, 2004). Teniendo en cuenta estos aspectos, el objetivo de este estudio fue seleccionar las concentraciones mínimas letales (CML) de higromicina B en la formación de callos y multiplicación de brotes de *D. purpurea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se empleó como material vegetal inicial semillas de *Digitalis purpurea* L. var. Rotter Berggold (Farmasaat GmbH, Alemania). Las semillas fueron germinadas y cultivadas *in vitro* en medio de cultivo semisólido siguiendo la metodología descrita por (Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

CML en la formación de callos

Como explante inicial se utilizaron fragmentos de hojas de aproximadamente 1.0 cm², procedentes

de plantas de *D. purpurea* cultivadas *in vitro*. Los explantes fueron colocados en medio de cultivo semisólido de formación de callos (MFC) compuesto por las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), 4 mg l⁻¹ de tiamina; 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 4.5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 3.0% de sacarosa y 3.0 g l⁻¹ de Gelrite® (Duchefa). El pH fue ajustado a 5.8 previo a la esterilización por autoclave.

La solución del Higromicina B (Duchefa) se preparó a 50 mg ml⁻¹, se esterilizó por filtración y se adicionó al MFC luego de la esterilización, cuando la temperatura del medio de cultivo estaba entre 40-45°C. Se realizaron seis tratamientos con 35 explantes cada uno, en los cuales se utilizaron las siguientes concentraciones de higromicina B: 0 (Control), 3 (tratamiento 1), 6 (tratamiento 2), 9 (tratamiento 3), 12 (tratamiento 4) y 15 mg l⁻¹ (tratamiento 5). Se colocaron cuatro explantes en cada frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, con 30 ml de medio de cultivo. Los explantes fueron subcultivados cada dos semanas. A las cuatro semanas se cuantificó el número de explantes que formaron callos y se calculó el porcentaje de callos formados por explante.

Luego de transcurridos 28 días de cultivo de los discos foliares en medio de cultivo con diferentes concentraciones de higromicina B, se determinó el área del explante en la cual hubo formación de callos. Para favorecer su evaluación se elaboró la escala descriptiva de grados representada en la Figura 1. Consecuentemente se distribuyeron rangos del 0-4, desde la no formación de callos en el

explante (grado 0), hasta el 100% de la superficie del explante con proliferación de callos (grado 4).

CML en la multiplicación de brotes

Para determinar la CML en la fase de multiplicación se utilizaron brotes en séptimo subcultivo de multiplicación de plantas de *D. purpurea* cultivadas *in vitro*, sin hojas y con una altura de 2.0±0.1 cm. Los brotes fueron colocados en medio de cultivo semisólido compuesto por sales MS con 4.0 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina, 100 mg l⁻¹ de mio-inositol, 30 g l⁻¹ de sacarosa y 3.0 g l⁻¹ de Gelrite® (Duchefa), con 0.5 µM de ácido indolacético (AIA) y 4.4 µM de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Los cultivos fueron incubados en cámara de crecimiento con luz solar y temperatura controlada de 27±2°C (Occegüera, 2008). Se realizaron subcultivos cada 15 días durante 30 días en frascos con 70 ml de medio de cultivo semisólido de multiplicación de brotes (Pérez-Alonso *et al.*, 2009). La solución del antibiótico (Duchefa) se preparó a 50 mg ml⁻¹, se esterilizó por filtración y se adicionó al MFC luego de la esterilización, cuando la temperatura del medio de cultivo estaba entre 40-45°C. Se realizaron cinco tratamientos con 35 explantes cada uno, en los cuales se utilizaron las siguientes concentraciones de higromicina B: 0 (Control), 25 (tratamiento 1), 50 (tratamiento 2), 75 (tratamiento 3) y 100 (tratamiento 4). A los 15 y 30 días de cultivo se cuantificó el número de hojas por brotes. Luego de transcurridos los 30 días se determinó la variación de la altura (diferencia entre la altura final y la inicial), se cuantificó el número de brotes muertos y se calculó el porcentaje de mortalidad.



Figura 1. Escala descriptiva empleada para evaluar el efecto de concentraciones variables de higromicina B, sobre discos foliares de *Digitalis purpurea* en medio de cultivo semisólido de formación de callos.

Procesamiento estadístico

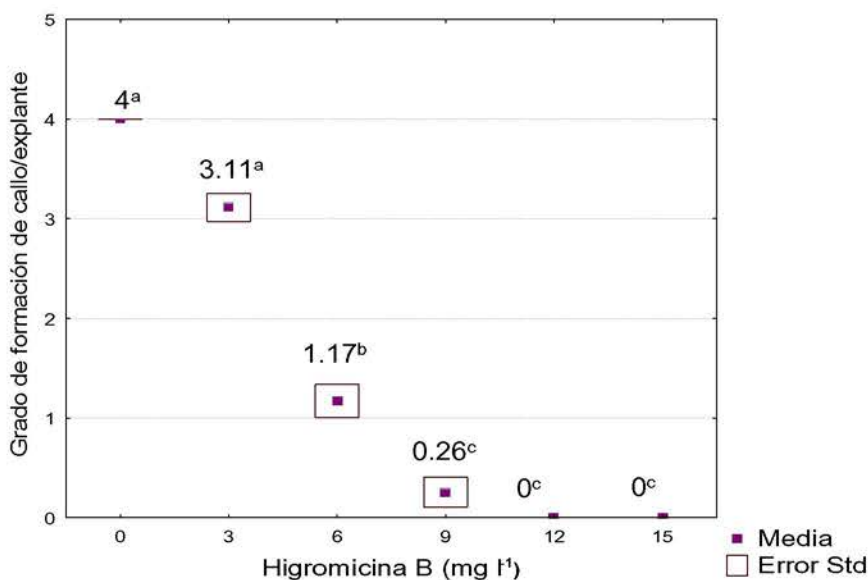
El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATISTICA versión 8 para Sistema operativo Windows. Se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis, Wilcoxon y comparación múltiple de medias a *posteriori*, previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza. Las variables fueron correlacionadas empleando la R de Spearman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la totalidad de los explantes incluidos en el control sin antibiótico se produjo formación de callos en más de un 75% del área del disco foliar (Figura 2). A diferencia de los restantes tratamientos (1-4), en los cuales se evidenció una disminución de los grados medios (asociados a la formación de callos por área del explante) según la escala descriptiva, hasta que no se obtuvieron callos. Existió una correlación negativa (R de Spearman -0.86, $p < 0.01$) entre el grado de formación de callos por explante y las concentraciones de higromicina B, en el rango evaluado (0-15 mg l⁻¹). Este

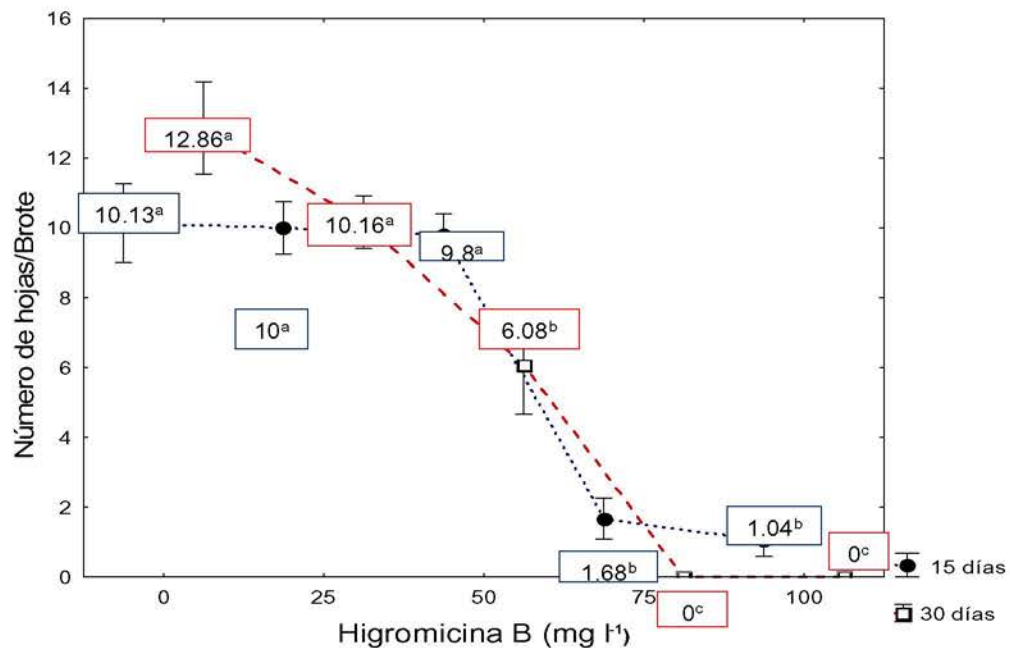
resultado mostró que un aumento de la toxicidad del antibiótico proporcional a su concentración, que conllevó a la muerte gradual de las células vegetales, hasta alcanzar valores que ocasionan la mortalidad de todo el tejido (tratamientos 4 y 5). Este comportamiento fue similar al descrito en la determinación de la concentración mínima inhibitoria de geneticina en el proceso de formación de callos de esta especie, en el cual se acrecentó el grado de afectación de los explantes con el aumento de las concentraciones de antibiótico evaluadas, hasta alcanzar un 100% de inhibición (Chong-Pérez *et al.*, 2008).

La concentración mínima letal es la menor concentración a la cual es posible alcanzar un 100% de mortalidad. Si se aplica este concepto a estos resultados es necesario seleccionar el tratamiento a partir del cual no se obtienen callos, lo cual aseguraría que, cuando se aplique en un sistema de selección, se eviten los escapes de células no transformadas. Por tanto, la concentración mínima letal de higromicina B en la formación de callos a partir de discos foliares de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido fue de 12 mg l⁻¹.



Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias a *posteriori*.

Figura 2. Efecto de higromicina B sobre la formación de callos a partir de discos foliares de *Digitalis purpurea* L. en medio de cultivo semisólido. Grados de la escala 0-5 (Figura 1).



Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias a posteriori.

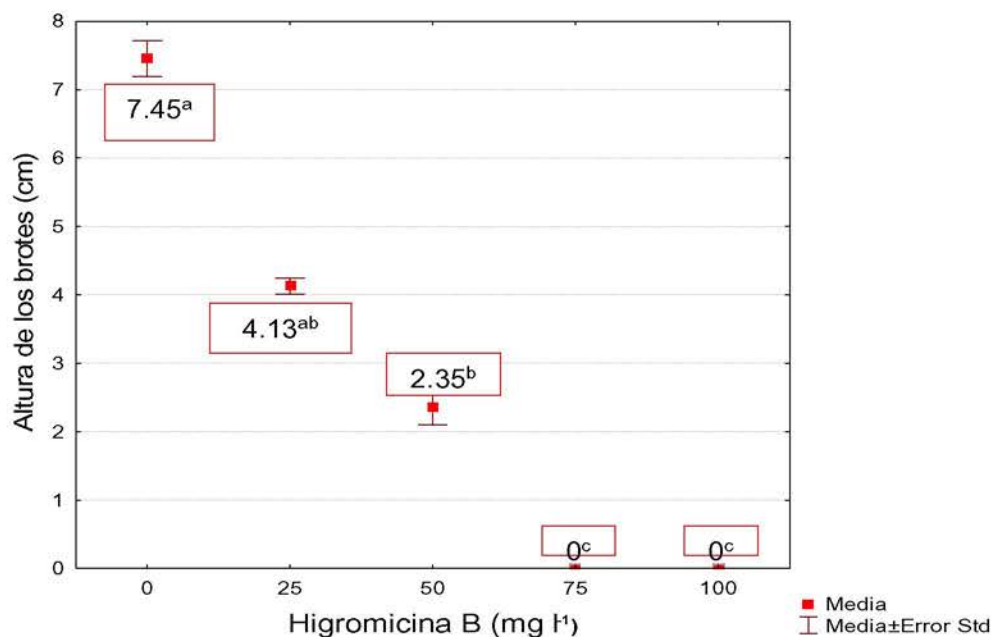
Figura 3. Efecto de higromicina B sobre brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 15 y 30 días de cultivo en medio de cultivo de multiplicación de brotes.

Al comparar las concentraciones seleccionadas de geneticina e higromicina B, para su empleo en un sistema de selección en el proceso de formación de callos de *D. purpurea*, la concentración necesaria del segundo antibiótico fue considerablemente inferior (5.8 veces). Consecuentemente, el empleo de higromicina B reduciría notablemente los costos asociados al uso de estos agentes (G418 49.17 Euro/g e higromicina B 115.72 Euro/g; Duchefa, 2012). Además, posibilitaría el empleo de otro agente selectivo, para, en el caso que lo amerite, retransformar plantas que ya contengan uno de estos genes marcadores de selección.

El número de hojas por brote, luego de transcurridos 15 y 30 días en medio de cultivo de multiplicación en presencia y ausencia de higromicina B, se representa en la Figura 3. Teniendo en cuenta que los explantes iniciales utilizados en el experimento no tenían hojas, su presencia indica que el agente selectivo no inhibió el crecimiento.

A los 15 días de cultivo en medio de multiplicación de brotes, no se detectaron diferencias significativas en el número de hojas por brote entre los tratamientos con 25 y 50 mg l⁻¹ de higromicina B, en relación con el control; a diferencia de los tratamientos 3 y 4, en los cuales fue posible observar una disminución significativa de este parámetro. Sin embargo, no se produjo una inhibición total del crecimiento del tejido foliar.

A los 30 días de cultivo en medio de multiplicación de brotes, los resultados fueron significativamente variables con respecto a los obtenidos a los 15 días, para los mismos tratamientos. Adicionalmente, fue posible detectar diferencias significativas con respecto al control en los tratamientos 2, 3 y 4 asociadas a la disminución del número de hojas por brote con aumentos de la concentración y tiempo de aplicación del agente selectivo. En presencia de las concentraciones de 75 y 100 mg l⁻¹ de higromicina B no se produjo crecimiento de hojas en ninguno de los brotes evaluados.



Valores medios con letras desiguales presentan diferencias significativas para $p < 0.05$ según la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias a posteriori.

Figura 4. Efecto de higromicina B, sobre brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 30 días de cultivo en medio de cultivo de multiplicación de brotes.

El análisis de estos resultados permite incluir el tiempo como otro factor a tener en cuenta al realizar un esquema de selección. Debido a que no se alcanzó un 100% de mortalidad del explante a los 15 días en medio selectivo, sino a los 30 días en presencia del antibiótico, a las concentraciones de 75 y 100 mg l⁻¹. Es posible concluir que, además de la mínima concentración letal del agente selectivo, también es necesario establecer el menor tiempo en el cual se produce el efecto inhibitorio de la higromicina B. Luego, para la eficiente selección de brotes transformados, el explante debe estar en contacto con el antibiótico durante no menos de 30 días.

La evaluación de la diferencia de la altura de los brotes luego de 30 días en medio de cultivo de multiplicación, permitió corroborar los resultados anteriormente descritos (Figura 4). En los tratamientos 2, 3 y 4 con concentraciones de 25-100 mg l⁻¹, se produjeron disminuciones significativas del crecimiento de los brotes con respecto al control. Se alcanzó una inhibición total, asociada al 100% de mortalidad, en los explantes mantenidos a concentraciones de 75 y 100 mg l⁻¹ de higromicina B.

Al analizar las características morfológicas de los brotes para cada uno de los tratamientos

(Figura 5A), los explantes en ausencia de antibiótico mostraron un mayor crecimiento, con una media de 12.86 hojas por brote y una coloración verde intensa. En contraste, en los tratamientos 3 y 4 los brotes se observaban completamente necrosados (Figura 5D y E), mientras que los brotes sometidos a concentraciones de 25 y 50 mg l⁻¹ de higromicina B, aún presentaban segmentos de coloración verde, algunas hojas y variaciones en la altura con respecto al valor inicial (media de 4.13 y 2.35 cm, respectivamente) (Figura 5B y C).

A partir de los resultados se comprobó que la mínima concentración letal de higromicina B para la selección de brotes de *D. purpurea* fue 75 mg l⁻¹, bajo las condiciones anteriormente especificadas.

De acuerdo con los protocolos de regeneración y transformación de *D. purpurea* a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas *in vitro*, se propone el siguiente esquema de selección. Es posible emplear como agente selectivo a la higromicina B en las fases de formación y multiplicación de callos (12 mg l⁻¹), luego del co-cultivo con *A. tumefaciens* y posteriormente aumentar las concentraciones durante la multiplicación de brotes (75 mg l⁻¹), y mantener en este medio de cultivo por no menos de 30 días.

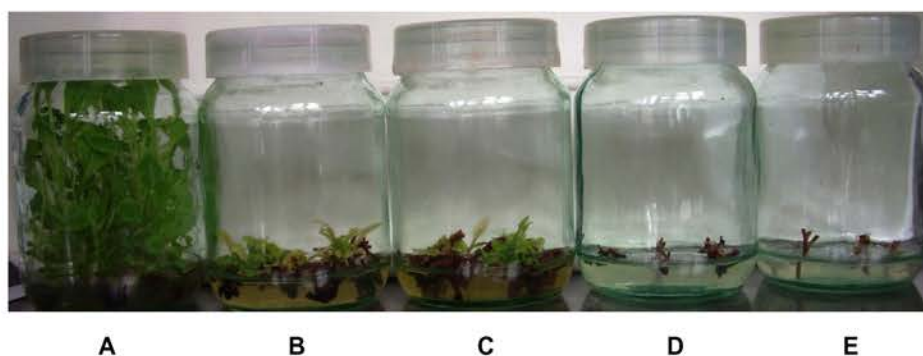


Figura 5. Brotes de *Digitalis purpurea* L. a los 30 días de cultivo con diferentes concentraciones de Higromicina B en medio cultivo de multiplicación. (A) Control 0 mg l⁻¹ (B) Tratamiento 1: 25 mg l⁻¹ (C) Tratamiento 2: 50 mg l⁻¹ (D) Tratamiento 3: 75 mg l⁻¹ (E) Tratamiento 4: 100 mg l⁻¹.

La evaluación de la diferencia de la altura de los brotes luego de 30 días en medio de cultivo de multiplicación, permitió corroborar los resultados anteriormente descritos (Figura 4). En los tratamientos 2, 3 y 4 con concentraciones de 25-100 mg l⁻¹, se produjeron disminuciones significativas del crecimiento de los brotes con respecto al control. Se alcanzó una inhibición total, asociada al 100% de mortalidad, en los explantes mantenidos a concentraciones de 75 y 100 mg l⁻¹ de higromicina B.

Al analizar las características morfológicas de los brotes para cada uno de los tratamientos (Figura 5A), los explantes en ausencia de antibiótico mostraron un mayor crecimiento, con una media de 12.86 hojas por brote y una coloración verde intensa. En contraste, en los tratamientos 3 y 4 los brotes se observaban completamente necrosados (Figura 5D y E), mientras que los brotes sometidos a concentraciones de 25 y 50 mg l⁻¹ de higromicina B, aún presentaban segmentos de coloración verde, algunas hojas y variaciones en la altura con respecto al valor inicial (media de 4.13 y 2.35 cm, respectivamente) (Figura 5B y C).

A partir de los resultados se comprobó que la mínima concentración letal de higromicina B para la selección de brotes de *D. purpurea* fue 75 mg l⁻¹, bajo las condiciones anteriormente especificadas.

De acuerdo con los protocolos de regeneración y transformación de *D. purpurea* a partir de segmentos foliares de plantas cultivadas *in vitro*, se propone el siguiente esquema de

selección. Es posible emplear como agente selectivo a la higromicina B en las fases de formación y multiplicación de callos (12 mg l⁻¹), luego del co-cultivo con *A. tumefaciens* y posteriormente aumentar las concentraciones durante la multiplicación de brotes (75 mg l⁻¹), y mantener en este medio de cultivo por no menos de 30 días.

En los métodos de transformación genética desarrollados solo la menor fracción de los tejidos es transformada, de esta forma los sistemas de selección son muy necesarios para identificar las células transformadas (Hadi *et al.*, 2002; Gallardo *et al.*, 2005). Determinar la concentración mínima letal del agente selectivo hace más económico el protocolo de transformación (Padilla y Burgos, 2010) y disminuye el tiempo asociado a la manipulación de grandes volúmenes de tejido transformado.

La estructura, función y efectos de los antibióticos aminoglucosídicos en plantas cultivadas *in vitro* y protocolos de transformación, ha sido revisado por Padilla y Burgos (2010). De acuerdo con lo planteado por estos autores, existen diversos factores a tener en cuenta para elaborar un sistema de selección efectivo con antibióticos de naturaleza aminoglucosídica. Entre otros, es necesario analizar el modo de acción del agente selectivo en células vegetales cultivadas *in vitro*, la complejidad del explante sometido a selección y las características del protocolo de transformación.

La susceptibilidad de las plantas a higromicina B es variable para las diferentes especies, genotipos y tejidos. Así es que, mientras mayor

y más compleja sea la estructura de un explante, más difícil será determinar la fitotoxicidad de estos compuestos, ya que existirán mecanismos que prevengan su llegada a la célula. Teniendo en cuenta estos aspectos, es aconsejable aplicar el agente selectivo inmediatamente después del proceso de transformación (para evitar la proliferación de células no transformadas) y antes de la regeneración de plantas, en las cuales las concentraciones necesarias para alcanzar dosis inhibitorias son altas, dada la complejidad del explante. Puede ser aconsejable establecer estos parámetros para cada medio de cultivo del protocolo, lo cual evitaría los comunes escapes y formaciones de quimeras referenciados en múltiples trabajos de transformación (Padilla y Burgos, 2010).

El esquema de selección propuesto en este trabajo cumple con estas premisas, por lo que su correcta aplicación debe asegurar la discriminación y obtención de plantas genéticamente modificadas.

Este constituye el primer informe de selección de concentraciones mínimas letales de higromicina B en la formación de callos y multiplicación de brotes de *D. purpurea*, para su empleo en un protocolo de transformación genética.

REFERENCIAS

- Bauer, P, Munkert J, Brydziun M, Burda E, Muller-Üri F, Groger H, Muller YA, Kreis W (2010) Highly conserved progesterone 5 α -reductase genes (P5 α R) from 5 α -cardenolide-free and 5 α -cardenolide producing angiosperms. *Phytochemistry* 71: 1495-1505
- Capell, T, Christou P (2004) Progress in plant metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 148-154
- Chong-Pérez, B, Pérez-Alonso N, Occeguera Z, Capote A, Pérez A, Jiménez EA (2008) Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Genetecina G418 en el proceso de formación de callos de *Digitalis purpurea* L. *Biotecnología Aplicada* 8(2): 115-118
- Eisenbeiß M, Kreis W, Reinhard E (1999) Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures. *Plant physiology and biochemistry* 37(1): 13-23
- Gallardo J, Kosky RG, Tejeda M, Posada-Pérez L, Herrera I, Reyes M, García L, Freire-Seijo M (2005) Dosis letal mínima del herbicida BASTA en plantas *in vitro* del híbrido de papaya IBP 42-99. *Biotecnología Vegetal* 5(1): 51-53
- Gavidia, I, Tarrío R, Rodríguez-Trelles F, Pérez-Bermúdez P, Seitz H (2007) Plant progesterone 5 α -reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5 α R from *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry* 68(6): 853-864
- Hadi, MZ, Keemper E, Wendeler E, Reiss B (2002) Simple and versatile selection of *Arabidopsis* Transformations. *Plant Cell Report* 21: 130-135
- Hagimori, M, Matsumoto T, Obi Y (1982a) Studies on the Production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture: II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiol.* 69(3): 653-656
- Hagimori, M, Matsumoto T, Obi Y (1982b) Studies on the Production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture III. Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Cell Physiol.* 23(7): 1205-1211
- Izquierdo, Y, Pérez-Alonso N, Jiménez EA (2010) Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos. *Biotecnología Vegetal* 10(3): 131-141
- Izquierdo, Y (2010) Transformación genética de *Digitalis purpurea* L. mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y análisis de genes candidatos para la sobreproducción de cardenólidos Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Biotecnología Vegetal, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 65 p
- Miki, B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol.* 107: 193-232
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Occeguera, Z (2008) Regeneración de plantas vía embriogénesis somática y estudio de agentes selectivos para la transformación genética de *Digitalis purpurea* L. Tesis presentada en opción al grado científico de Máster en Biotecnología vegetal, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, 68 p.
- Padilla, IMG, Burgos L (2010) Aminoglycoside antibiotics: structure, functions and effects on *in vitro* plant culture and genetic transformation protocols. *Plant Cell Reports* 29: 1203-1213

Parveez, G, Chowdhury M, Saleh NM (1996) Determination of Minimal Inhibitory Concentration of Selection Agents for Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Transformation. Asia Pac. J. Mol. Bio. Biotechnol 4: 219-228

Pérez-Alonso, N, Wilken D, Gerth A, Jahn A, Nitzsche HM, Kerns G, Capote A, Jiménez EA (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. Plant Cell Tiss Organ Cult 99: 151–156

Sales, E, Frieder M, Nebauer SG, Segura J, Kreis W, Arrillaga I (2011) *Digitalis*. En: C Kole (Ed.) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Plantation and Ornamental Crops, pp. 73-111. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Recibido: 13-11-2012

Aceptado: 17-12-2012